

**EVALUACIÓN DEL ESTADO TAXONÓMICO DEL CUCARACHERO DE
NICÉFORO *THRYOTHORUS NICEFORI* (AVES: TROGLODYTIDAE)
MEDIANTE MÉTODOS MORFOLÓGICOS Y GENÉTICOS.**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OBTENER AL
TÍTULO DE BIÓLOGO**

KORIK VARGAS MORENO

Director

CARLOS DANIEL CADENA

Ph.D. Biología

Codirectores

JUAN LUÍS PARRA

Candidato Ph.D.

JUAN ARMANDO SÁNCHEZ

Ph.D Biología Marina

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

BOGOTÁ D.C.

2007

RESUMEN

Los planes de conservación que se basan en las especies como unidades focales deben estar basados en clasificaciones en las que las especies estén bien delimitadas. Sin embargo, la validez taxonómica de algunas especies prioritarias para conservación ha sido puesta en duda. Por ejemplo, *Thryothorus nicefori* es una especie endémica de Colombia que se encuentra críticamente amenazada por su tamaño poblacional pequeño y distribución restringida al enclave seco del Cañón del Chicamocha, y algunos autores han sugerido que no merece ser considerada como una especie válida, sino como una subespecie de *T. rufalbus*, una especie no amenazada de amplia distribución. Realicé una revisión del estatus taxonómico de *T. nicefori* mediante análisis moleculares y morfológicos. Secuencié el gen mitocondrial citocromo *b* para un total de 18 individuos, incluyendo 8 individuos de *T. nicefori*, y 4 y 6 individuos, respectivamente, de las dos subespecies de *T. rufalbus* que se encuentran en Colombia, *T. r. cumanensis* y *T. r. minlosi*. También realicé comparaciones de la coloración de plumaje entre los tres taxones por medio de espectrofotometría en un total de 31 individuos (11 *T. nicefori*, 11 *T. r. minlosi* y 9 *T. r. cumanensis*). Análisis filogenéticos basados en los datos moleculares muestran que *T. nicefori*, *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis* forman grupos recíprocamente monofiléticos que parecen haberse separado hace cerca de dos millones de años, pero las relaciones entre estos tres clados no están claramente establecidas. Los tres taxones también son diagnosticables con base en sus patrones de coloración, principalmente del dorso. Los resultados sugieren que *T. nicefori* es una especie válida, por lo que éste debe seguir siendo considerado un taxón con alta prioridad de conservación.

Tabla de Contenidos

RESUMEN	2
Índice de Tablas	4
Índice de Figuras	5
AGRADECIMIENTOS	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. OBJETIVOS	9
3. METODOLOGÍA	9
Trabajo de campo	9
Análisis moleculares	10
Morfometría	12
Coloración de Plumaje	13
4. RESULTADOS	16
Análisis moleculares	16
Análisis de color	17
<i>Brillo</i>	18
<i>Croma</i>	19
<i>Tono</i>	19
Análisis morfométricos	19
5. DISCUSIÓN	20
6. CONCLUSIONES	24
7. BIBLIOGRAFÍA	26
8. ANEXOS	43

Índice de Tablas

Tabla 1. Información de localidades de colecta y número de catalogo de museos.	31
Tabla 2. Valores no corregidos de la divergencia de las secuencias (distancia p).	32
Tabla 3. Medidas morfométricas (mm) de adultos de <i>T. nicefori</i> , <i>T. r. minlosi</i> y <i>T. r. cumanensis</i>	32

Índice de Figuras

Figura 1: Sitios de muestreo de las tres poblaciones.....	33
Figura 2: Relación filogenética de <i>T. nicefori</i> , <i>T. r. minlosi</i> y <i>T. r. cumanensis</i> junto con representantes de todas las especies de <i>Thryothorus</i> y géneros de Troglodytidae.....	34
Figura 3: Relación filogenética de <i>T. nicefori</i> , <i>T. r. minlosi</i> , <i>T. r. cumanensis</i> y el grupo externo basados en las secuencias del gen mitocondrial <i>cyt-b</i> . Análisis de máxima parsimonia.....	35
Figura 4: Relación filogenética de <i>T. nicefori</i> , <i>T. r. minlosi</i> y <i>T. r. cumanensis</i> y el grupo externo, basados en las secuencias del gen mitocondrial <i>cyt-b</i> . Análisis de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud	36
Figura 5: Espacio de color. Análisis de componentes principales (ACP) con los datos obtenidos del espectrofotómetro de las cinco partes del cuerpo analizadas.....	37
Figura 6: Espacio de color. Análisis de componentes principales (ACP) con los datos obtenidos del espectrofotómetro de las cinco partes del cuerpo analizadas.....	38
Figura 7: Análisis discriminante con los datos obtenidos del espectrofotómetro de intensidad relativa de las cinco partes del cuerpo analizadas.....	39
Figura 8: Análisis discriminante con los datos de Croma, correspondientes a las cinco partes del cuerpo analizadas.....	40
Figura 9: Análisis discriminante con los datos obtenidos del espectrofotómetro de intensidad relativa (B, G, Y, R) de las cinco partes del cuerpo analizadas.....	41
Figura 10: Análisis discriminante con los datos obtenidos de las medidas morfométricas de las cinco partes del cuerpo analizadas.....	42

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle a C. Daniel Cadena, director de este estudio, todo su apoyo y dedicación durante esta investigación. Gracias por asumir este trabajo como propio y haberme dado la oportunidad de ser parte del Laboratorio de Biología Evolutiva de Vertebrados. A Juan Luis Parra, codirector, muchas gracias por sus valiosos comentarios y soporte técnico con los análisis de color. Al profesor Gary Stiles (Instituto de Ciencias Naturales) y el Hermano Roque Casallas (Museo de La Salle), muchas gracias por permitirme trabajar con los especímenes del museo. A Nicolás Dávila y Juan Pablo Gómez, gracias por el apoyo incondicional y por su buen ambiente de trabajo. A Sandra Valderrama y Jorge Parra gracias por sus aportes y colaboración en campo. También quiero agradecerle a mis compañeros Andrea Morales, Juan Camilo Muñoz e Iliana Rocío por sus oportunas sugerencias. Por último, a mis padres, quienes como siempre apoyaron mis ideas y me permitieron desarrollar este proyecto.

1. INTRODUCCIÓN

Distintas definiciones de especie han sido elaboradas dependiendo de la rama de investigación desde la cual se analicen, por lo que los conceptos de especie han sido materia de discusión por muchos años (Mayden 1997). Sin embargo, filosóficamente no hay dificultades mayores en cuanto al aspecto ontológico de las especies si se tiene en cuenta que todos los “conceptos” reúnen un elemento común: que las especies son segmentos de linajes poblacionales (De Queiroz 1999, 2005). Un mayor problema radica en la parte práctica, donde no ha sido posible establecer criterios generales para reconocer diferentes especies en la naturaleza (De Queiroz 2005). Criterios como diferencias morfológicas o ecológicas, relaciones filogenéticas, o aislamiento reproductivo han sido importantes a la hora de delimitar las especies (Sites & Marshall 2003), pero no se ha podido establecer un conjunto de criterios ampliamente aplicables.

Generalmente se habla de especies como unidades que mantienen cierta independencia entre sí, y que han sido ampliamente utilizadas como indicadoras de diversidad en la naturaleza (Cracraft 1989; Rojas 1992). Por esta razón, la delimitación de especies tiene un valor importante en cuanto a conservación de la biodiversidad se refiere. Los criterios para la escogencia de áreas protegidas muy frecuentemente están basados en la presencia de especies amenazadas, y proyectos como los Libros Rojos de Especies Amenazadas y la identificación de AICAS (áreas de importancia para la conservación de las aves), tienen como unidad focal a las especies (ej. Renjifo et al 2002, Franco y Bravo 2005). Por tanto, errar en la delimitación de especies puede ocasionar el desperdicio de fondos destinados a proyectos de conservación, o, en el peor de los casos, el fin de la historia evolutiva de un taxón importante no reconocido como especie por establecer como prioridad la protección de una población que no representa una especie válida.

De las 162 especies de aves amenazadas que se encuentran en Colombia (Renjifo et al. 2002), existen algunas para las cuales hay incertidumbre en cuanto a si son o no especies válidas. De hecho, dos estudios recientes mostraron que *Sporophila insulata*, una especie endémica de Colombia considerada críticamente amenazada (Reyes 2002), en realidad no corresponde a una especie válida (Stiles 2004, De Las Casas 2004; ver

también Johnson et al. 2005). Otra ave amenazada con estado taxonómico incierto es el Cucarachero de Nicéforo (*Thryothorus nicefori*), una especie endémica de Colombia que se encuentra en peligro crítico (CR) por su tamaño poblacional pequeño y distribución restringida a los bosques riparios y xerofíticos del enclave seco del Cañón del Chicamocha (Birdlife International 2000, López-Lanús & Cadena 2002, Valderrama 2005). *Thryothorus nicefori* fue descrita como una especie distinta de *T. rufalbus* debido a diferencias en plumaje (Meyer de Schauensee 1946), pero la descripción original no fue basada en comparaciones detalladas de los patrones de coloración con poblaciones de *T. rufalbus*, de manera que la significancia de las diferencias notadas por Meyer de Schauensee no es del todo clara. Además, según características morfológicas y comportamentales se ha sugerido que *T. nicefori* podría más bien tratarse de una subespecie de *T. rufalbus* (Ridgely & Tudor 1989; Collar et al. 1992, Brewer 2001, López-Lanús y Cadena 2002), una especie no amenazada que se distribuye ampliamente en América Central y el norte de América del Sur, de la cual existen dos subespecies en Colombia: *T. rufalbus cumanensis* y *T. rufalbus inlosi*.

Debido a la distribución restringida y a la degradación del hábitat de *T. nicefori*, es importante realizar medidas urgentes para asegurar su conservación (López-Lanús & Cadena 2002). Sin embargo, entendiendo que generalmente las especies son las unidades focales de conservación y manejo, es fundamental poder establecer si *T. nicefori* es una especie válida o no. En particular, resulta clave determinar si *T. nicefori* es una unidad evolutiva independiente de *T. rufalbus* (Cadena 2003; ver también Johnson et al. 2005). Aparte de la perspectiva de conservación, esclarecer el estatus taxonómico de *T. nicefori* es importante para otros campos de la biología, pues las especies son las unidades en las que muchos biólogos orgánicos se enfocan para realizar sus investigaciones en distintos campos (Rojas 1992). Debido a la importancia de resolver la incertidumbre que existe alrededor del estatus taxonómico de *T. nicefori*, este estudio tiene como objetivo principal evaluar la hipótesis de que este taxón representa una especie válida utilizando métodos moleculares y morfológicos.

2. OBJETIVOS

- (1) Realizar una evaluación del estado taxonómico de *T. nicefori* por medio de caracteres moleculares y morfológicos.
- (2) Presentar una hipótesis sobre la historia evolutiva y biogeográfica de *T. nicefori* con base en análisis de datos moleculares
- (3) Realizar aportes al estado de conservación de *T. nicefori* y dar continuidad a proyectos enfocados en su preservación.

3. METODOLOGÍA

Para determinar el estado taxonómico de *T. nicefori* realicé análisis moleculares basados en secuencias de ADN mitocondrial, y comparaciones morfométricas y de coloración de plumaje entre *T. nicefori* y poblaciones de las dos subespecies colombianas de *T. rufalbus*.

Trabajo de campo

Capturé aves en el campo por medio de redes de niebla y con la ayuda de “playbacks” de vocalizaciones previamente grabadas. Los lugares de muestreo para *T. nicefori* se ubicaron en el departamento de Santander en cercanías al Cañón del Chicamocha, en puntos donde se había reportado la especie en los municipios de Curití, Barichara y San Gil. Las capturas de *T. rufalbus cum anensis* las realicé en los departamentos de Cesar y Magdalena, en localidades que hacen parte del macizo de la Sierra Nevada de Santa Marta (Tabla 1, Figura 1). Algunos individuos fueron capturados para tomar medidas morfométricas y muestras de plumas para análisis morfológicos y genéticos y luego liberados, y otros fueron colectados y depositados en los museos de la Universidad de los Andes y el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional (Tabla 1). Los individuos colectados representan especímenes “voucher” que asocian de forma permanente datos genéticos y morfológicos con un individuo particular, lo que permite que la verificación independiente de mis análisis sea posible (Remsen 1995) y evita algunos de los problemas que pueden tener los estudios moleculares que se basan sólo en muestras de sangre o plumas de aves capturadas y liberadas (Bates et al. 2004).

En el caso de *T. rufalbus minlosi*, no se realizó ninguna captura, pues se contó con un buen número de especímenes disponibles en museos de historia natural. Dichos

especímenes eran provenientes de los Departamentos del Meta, Cundinamarca, Boyacá y Norte de Santander (Tabla 1, Figura 1).

Análisis moleculares

La extracción de ADN fue hecha a partir del músculo pectoral de los individuos colectados en campo, del raquis de las plumas de individuos capturados pero no colectados, y de tejidos de las patas de especímenes de museo (ver Mundy et al. 1997). El protocolo seguido fue el del kit de extracción de Qiagen (DNeasy Tissue Kit), excepto para las muestras de plumas o de piel de especímenes antiguos, para las cuales realicé una extracción de fenol-cloroformo. Para realizar este procedimiento, las muestras fueron inicialmente digeridas con 300 µl de CTAB (2x), 20 µl de Proteinasa K (10 mg/ml), y 30 µl de Dithiothreitol al 10% (DTT). Luego realicé lavados con 300 µl de fenol-cloroformo (25:24:1), 300 µl de cloroformo isoamil alcohol (24:1) y 800 µl de etanol absoluto para separar el ADN de los residuos. Finalmente, para preservar el ADN, agregue un volumen de TE (buffer de EDTA), variando entre 10 y 20 µl según la cantidad de ADN obtenido.

Del ADN obtenido, amplifiqué y secuencié un fragmento de cerca de 1000 pares de bases del gen mitocondrial citocromo *b*, que ya ha sido secuenciado para varias especies de *Thryothorus* y otros géneros de Troglodytidae (Barker 2004, Mann et al. 2006). Los primers usados en la amplificación y secuenciación fueron L14996, H15646, L15413 y H16064 (Sorenson et al. 1999). La amplificación del gen citocromo *b* mediante PCR, fue hecha en un termociclador PTC-200 (MJ Research), con un tiempo inicial de denaturación de 2 min. a 94°C, seguido de 35 ciclos compuestos de una fase de denaturación a 94 C por 45 segundos, una de anillamiento a 52°C durante 30 seg. y una de extensión de 72°C por 60 seg., y finalmente por una última etapa de extensión de 10 min. a 72°C. Se trabajó con un volumen final de 25 µl, compuestos de 16.5 µl de agua, 2.5 µl de buffer 10X, 1.5 MgCl₂, 1.2 µl de cada primer, 0.125 µl de *Taq* DNA polimerasa recombinante (Invitrogen) y 1 µl del templado de ADN. Con muestras de plumas y especímenes antiguos, usé *Taq* DNA polimerasa Platinum (Invitrogen). La purificación de los productos de PCR fue hecha con el tratamiento ExoSap, compuesto de la enzima Exonucleasa I que degrada los primers residuales del PCR y la enzima fosfatasa alcalina (Shrimp Alkaline Phosphatase) que desfosforila los dNTPs sobrantes. La secuenciación la realicé con los mismos primers usados en la amplificación,

empleando el kit Big Dye Terminador (ABI). Los productos fueron purificados con etanol y acetato de sodio, y utilicé un secuenciador ABI 3730XL para correr las muestras.

Las secuencias obtenidas fueron revisadas y juntadas con el programa SeqMan (DNASTar), y posteriormente alineadas a ojo con la ayuda de un editor de texto. Para determinar si efectivamente *T. nicefori* está estrechamente emparentado con *T. rufalbus*, y descartar la posibilidad de que sea más cercano a otra especie, realicé un análisis filogenético utilizando una matriz de secuencias de citocromo *b* generadas por estudios previos (Barker 2004, Mann et al. 2006). Incluí casi todas las especies de *Thryothonus*, representantes de todos los géneros de Troglodytidae y varios grupos externos, junto con una secuencia de *T. nicefori*, una de *T. r. minlosi* y una de *T. r. cumanensis* obtenidas en este estudio. Para este análisis emplee el método de máxima parsimonia con una búsqueda heurística, y realicé un análisis de bootstrap de 100 réplicas en el programa PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002). Los resultados de este análisis también me ayudaron a determinar de una manera apropiada los grupos externos a utilizar en los análisis filogenéticos que incluyeron todas mis secuencias.

Las relaciones filogenéticas entre haplotipos de *T. nicefori*, *T. r. cumanensis* y *T. r. minlosi* fueron inferidas utilizando máxima parsimonia, máxima verosimilitud y el método de inferencia Bayesiana. Estos análisis fueron realizados en PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002) y MrBayes 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck 2003), y estuvieron basados en las secuencias del gen citocromo *b* para un total de 18 individuos (Tabla 1). En el análisis de máxima parsimonia usé una búsqueda heurística adicionando secuencias por pasos de manera aleatoria (Random Stepwise Sequence Addition) para un total de 10 réplicas, empleando el algoritmo tree-bisection-reconnection (TBR). Para evaluar el soporte de los nodos realicé un análisis de bootstrap de 1000 réplicas. En el análisis de máxima verosimilitud, el modelo de sustitución de nucleótidos empleado fue el TVM + I, determinado por el criterio de información de Akaike (AIC) por medio de ModelTest versión 3.7 (Posada & Crandall 1998). Realicé una búsqueda heurística adicionando secuencias al azar con un total de 10 réplicas, por medio del algoritmo TBR. El cálculo del soporte de los nodos fue hecho con un análisis de bootstrap de 1000 réplicas. Para realizar el análisis de inferencia Bayesiana, usé el programa MrBayes versión 3.1 (Altekar et al. 2004). El muestreo fue hecho por medio de cuatro cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), durante 10 millones de generaciones. Se ejecutaron dos análisis

independientes para asegurar que los resultados arrojaran información confiable sobre las probabilidades posteriores, independientemente de las condiciones iniciales. Los resultados obtenidos fueron evaluados usando el programa AWTY (Wilgenbusch et al. 2004), para establecer la correspondencia entre los resultados de los dos análisis independientes y evaluar el número de generaciones necesario para lograr estabilización en las probabilidades posteriores de los diferentes clados. La verosimilitud de los árboles y las probabilidades posteriores no mostraron mayores cambios después de un millón de generaciones, por lo que, de forma conservadora, descarté los primeros dos millones de generaciones y construí un árbol de consenso entre los árboles muestreados durante los 8 millones de generaciones restantes. Los resultados de los dos análisis independientes fueron idénticos.

Examiné la variación genética entre *T. nicefori*, *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis* por medio del programa Mega 3.1. (Kumar et al, 2004), estimando los valores no corregidos de la divergencia de las secuencias (distancia p), dentro de cada taxón y entre pares de taxones. De igual forma calculé la variación genética entre los tres taxones colombianos y una secuencia de una subespecie centroamericana de *T. rufalbus* (*T. r. castanotus*) obtenida del estudio de Mann et al. (2006).

Morfometría

Realicé análisis morfométricos con el objetivo inicial de determinar si existen diferencias en tamaño y forma entre *T. nicefori* y las poblaciones colombianas de *T. rufalbus* (*T. r. cumanensis* y *T. r. minlosi*). Si existen diferencias significativas entre *T. nicefori* y *T. rufalbus*, es importante determinar si éstas exceden las diferencias presentes entre las dos subespecies de *rufalbus*. De ser así, habría otra razón para argumentar que *T. nicefori* merece ser considerada una especie válida (Remsen 2005, Helbig et al. 2002).

Realicé comparaciones entre especímenes de *T. r. minlosi*, *T. r. cumanensis* y *T. nicefori* depositados en las colecciones del Instituto de Ciencias Naturales (Universidad Nacional de Colombia), La Universidad de la Salle y La Universidad de los Andes (Tabla 1). A cada espécimen le tomé las siguientes medidas: longitud del culmen expuesto, longitud del pico desde la narina, alto del pico a la altura de la narina, longitud del tarso, longitud del ala cuerda y longitud de la cola (Stiles 2004). Todas las

medidas fueron realizadas con una precisión de 0.1 mm, utilizando un calibrador de reloj Spi 2000. Sólo realicé comparaciones entre los individuos depositados en museos, porque los individuos capturados en campo no fueron suficientes para realizar comparaciones entre los tres grupos.

Los datos que no presentaron una distribución normal (pruebas de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov), fueron transformados con Log_{10} . Para determinar si existían diferencias significativas en el tamaño del cuerpo entre *T. nicefori* y *T. rufalbus*, realicé un análisis de varianza (ANOVA) con las medidas que obtuve de cada parte del cuerpo y posteriormente una prueba de Tukey, con el fin de conocer entre cuáles grupos existían diferencias significativas en cada medida. Luego realicé un análisis discriminante para determinar si los especímenes de los tres grupos podían ser distinguidos estadísticamente. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SPSS 14.0.

Coloración de Plumaje

Realicé análisis de coloración de plumaje con muestras de individuos capturados en campo y con especímenes de museo depositados en las colecciones del Instituto de Ciencias Naturales, la Universidad de la Salle y la Universidad de los Andes (Tabla 1). Las plumas analizadas fueron obtenidas de la parte dorsal (espalda y nuca), del cuello, el pecho y de los flancos, debido a que éstas son las regiones corporales que presentan diferencias más marcadas entre *T. nicefori* y *T. rufalbus* (Meyer de Schauensee 1946).

Para realizar análisis de variación de color, se han desarrollado muchas técnicas, en su mayoría basadas en el sistema de percepción visual humano. Debido a que las aves poseen cuatro pigmentos visuales, uno más que los humanos, éstas perciben un mayor rango de longitudes de onda en el espectro (p.ej., ultravioleta 320 – 400nm; Goldsmith 2006), por lo que es necesario realizar mediciones del patrón de color con métodos que no estén determinados por el sistema visual humano. Una medida precisa, independiente de cualquier sistema visual, y que abarca la totalidad del espectro visible en aves, puede ser realizada por medio de un espectrofotómetro (Endler 1990). Para cuantificar el color en *T. nicefori* y *T. rufalbus*, utilicé un espectrofotómetro USB2000 (Ocean Optics) junto con una fuente de luz halógena y de tungsteno (300 – 800 nm), y una sonda bifurcada que transmite la luz hacia la muestra y lleva la luz reflejada por la muestra hacia el

espectrofotómetro. Todas las medidas de reflectancia fueron tomadas con relación a un estándar certificado de Spectralon[®] de Labsphere[®]. Medí el color de las plumas individualmente sobre un plano a un ángulo de 45°, eliminando al máximo la reflexión especular (Endler 1990). Para cuantificar los espectros de reflectancia para distintas longitudes de onda usé el programa OOIbase (Hoekstra et al. 2005). De esta manera fue posible cuantificar todos los componentes del color de una manera objetiva y estos datos pueden ser analizados de acuerdo a varios sistemas de percepción (Endler 2005).

Para examinar la variación en el patrón de coloración entre taxones, mis análisis fueron enfocados en tres aspectos usados generalmente para describir colores (Endler 1990): 1) Tono, que corresponde al significado “popular” del color, y está relacionado con la longitud de onda de mayor pendiente y con el signo de esta pendiente; 2) Cromo o saturación, que se refiere a la “pureza” del color y cuantifica cómo varía la intensidad de reflexión con la longitud de onda; y 3) Brillo, relacionado con la intensidad lumínica total reflejada (Quesada & Senar 2006). Todas las medidas anteriores fueron basadas en valores de reflectancia para longitudes de onda entre los 320 y 700 nm, un rango que incluye la totalidad del espectro visible para las aves.

Para obtener el tono, croma y brillo de las plumas seguí la metodología descrita por Endler (1990), la cual está basada en aspectos comunes del sistema de percepción visual en vertebrados, pero que es independiente de cualquier sistema visual en particular. La metodología consiste en una clasificación por segmentos discretos del espectro, que representan los rangos de absorción de los diferentes pigmentos visuales. Originalmente, este método fue utilizado sólo para el rango visible por humanos (400-700nm) y cada segmento correspondía a los rangos de reflectancia de los colores azul (Q_B), verde (Q_G), amarillo (Q_Y) y rojo (Q_R). Sin embargo, este método no está restringido al rango visual humano y en este caso el espectro es dividido en cuatro partes iguales entre 320 y 700 nm, siendo posible calcular la intensidad lumínica reflejada para cada uno de los segmentos ($Q_B=320 - 414$ nm, $Q_G=415 - 509$ nm, $Q_Y=510 - 604$ nm y $Q_R=605 - 700$ nm). Luego, con la intensidad total (Q_T) que se calcula como el área bajo el espectro entre 320 y 700 nm, se estima el brillo para cada segmento, que corresponde a la intensidad relativa de cada uno de los segmentos con respecto a la intensidad total ($B=Q_B/Q_T$, $G=Q_G/Q_T$, $Y=Q_Y/Q_T$ y $R=Q_R/Q_T$). Posteriormente, con base en la relación entre intensidades relativas de varios pares de segmentos, es posible obtener

medidas del tono y la saturación del color (croma) que son independientes de la intensidad total del color mediante las siguientes ecuaciones.

$$LM = R - G \quad \text{y} \quad MS = Y - B$$

$$\text{Croma (C)} = \sqrt{LM^2 + MS^2} \quad \text{y} \quad \text{Tono} = \arccos(LM / C)$$

En estas ecuaciones, LM representa las diferencias entre las intensidades relativas de los segmentos R y G, relacionados con los pigmentos visuales rojo y verde respectivamente. De igual forma, MS corresponde a las diferencias entre Y y B, asociados con los pigmentos visuales amarillo y azul.

Para evaluar las diferencias en coloración entre *T. nicefori*, *T. r. cumanensis* y *T. r. minlosi*, realicé análisis multivariados. Inicialmente, realicé un análisis de componentes principales (ACP), que es probablemente el más apropiado para trabajar con este tipo de datos en situaciones en las que se conoce poco, y no se tiene en cuenta en detalle, el sistema visual del organismo estudiado (Endler, 1990; Rosenblum, 2006). El ACP se realizó de manera exploratoria con el fin de determinar si existía algún agrupamiento entre los individuos estudiados, y de ser así, identificar las variables de color que podrían estar relacionadas con dicho agrupamiento. Las variables incluidas en el análisis fueron la intensidad para cada segmento de absorción (de acuerdo a los pigmentos visuales verde, rojo, azul y amarillo) y la parte del cuerpo analizada, de manera que en total se incluyeron 20 variables en el análisis (i.e. cuatro segmentos del espectro por cinco partes del cuerpo) para un total de 31 individuos. Posteriormente, con los datos obtenidos de croma, tono y brillo realicé un análisis discriminante independiente para cada uno de ellos y de forma conjunta con todas las partes del cuerpo. Las variables analizadas con los valores de brillo correspondieron a la intensidad relativa de cada uno de los segmentos y la parte del cuerpo analizada (20 variables). En el caso del tono y croma cada parte del cuerpo esta representada por un único valor, que no varía con respecto a los segmentos (B, G, Y y R). De nuevo, el objetivo de este análisis era determinar si los tres taxones pueden ser diferenciados estadísticamente con base en su coloración. Realicé una tabla de clasificación (opción del análisis discriminante) que me permitió conocer el porcentaje de individuos de cada taxón, que puede ser distinguible de los demás grupos.

4. RESULTADOS

Capturé un total de 11 individuos en el campo, ocho *T. nicefori* y tres *T. r. cumanensis*. De estos, algunos fueron colectados y preparados como pieles de estudio, con sus tejidos conservados para estudios genéticos (Tabla 1). Durante mi trabajo de campo obtuve registros de *T. nicefori* del municipio de Floridablanca (Santander), lo que supone una extensión de 50 km hacia el norte del rango de distribución conocido de la especie (López-Lanús y Cadena 2002; Parra et al 2005). A pesar de realizar visitas a localidades en el Magdalena medio (ej. Aguachica, Gamarra, y Codazzi) en donde se esperaba encontrar a *T. rufalbus* de acuerdo a registros previos (Hilty & Brown, 1986), no fue posible encontrar a la especie allí.

Análisis moleculares

Obtuve secuencias del gen citocromo *b* para un total de 18 individuos: 8 de *T. nicefori*, 4 de *T. r. cumanensis* y 6 de *T. r. minlosi*. Para la mayoría de los individuos obtuve secuencias de cerca de 1000 pares de bases, pero para algunos sólo fue posible secuenciar un poco más de 650 pares de bases. Entre todos estos individuos, se encontraron un total de 10 haplotipos diferentes de citocromo *b*, de los cuales cuatro correspondieron a *T. nicefori*, tres a *T. r. cumanensis* y tres a *T. r. minlosi*.

La suposición de que *T. nicefori* está más estrechamente emparentada con *T. rufalbus* que con otras especies, resultó estar fuertemente apoyada por los resultados del análisis de máxima parsimonia, ya que un clado formado por *T. nicefori* y secuencias de *T. rufalbus* de Costa Rica (Mann et al. 2006) y Colombia (este estudio) recibió un valor de bootstrap del 100% (Figura 2). Adicionalmente, fue posible establecer que el grupo hermano de *T. nicefori* y *T. rufalbus* es un clado formado por *T. sinaloa* y *T. pleurostictus*, por lo que estas especies fueron incluidas como grupo externo en los análisis filogenéticos más detallados entre *T. nicefori*, *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis*, junto con *T. leucopogon* como un grupo externo más distante.

Los valores no corregidos de la divergencia de las secuencias (distancia *p*), muestran que los niveles de variación dentro de *T. nicefori*, *T. rufalbus minlosi* y *T. rufalbus cumanensis* son bajos (inferiores al 0.44%). Dentro de *T. r. cumanensis* existió una divergencia menor a 0.01% entre los tres haplotipos encontrados, y en el caso de *T.*

nicefori y *T. r. minlosi* la divergencia promedio entre secuencias fue de 0.16% y 0.20%, respectivamente. Por su parte, la variación genética entre los tres taxones fue alta, siendo superior en todos los casos al 3% (Tabla 2). La divergencia promedio entre los tres taxones colombianos y la subespecie centroamericana *T. r. castanotus* fue aún mayor, alcanzando el 4.62%.

Los análisis filogenéticos indicaron que *T. nicefori* y *T. rufalbus* forman un clado fuertemente apoyado, que fue observado en los análisis de máxima verosimilitud (bootstrap 92%), máxima parsimonia (bootstrap 100%) y de inferencia bayesiana (probabilidad posterior 1.0) (Figuras 3 y 4). Los tres métodos de inferencia filogenética indican que al interior de este clado, *T. nicefori*, *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis* son grupos recíprocamente monofileticos. En el análisis de parsimonia, obtuve un total de 60 árboles igualmente parsimoniosos (272 pasos, índice de consistencia 0.67, índice de retención 0.85), y el análisis de bootstrap apoyó fuertemente la monofilia de *T. nicefori* (100%), *T. r. minlosi* (100%) y *T. r. cumanensis* (98%) (Figura 3). De igual forma, el análisis de máxima verosimilitud apoyó la monofilia de los tres taxones, aunque en menor medida (92, 91 y 78% de bootstrap, respectivamente) (Figura 4). Igualmente, las probabilidades posteriores obtenidas mediante el análisis Bayesiano apoyan la monofilia de *T. nicefori* (1.0), *T. r. minlosi* (0.98) y *T. r. cumanensis* (0.95) (Figura 4).

No fue posible establecer con certeza la relación entre *T. nicefori*, *T. r. cumanensis* y *T. r. minlosi*. En el consenso estricto de los árboles más parsimoniosos los taxones *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis* aparecen como grupos hermanos, pero este resultado recibió un valor de bootstrap inferior al 50%. En el análisis de máxima verosimilitud, de nuevo los taxones *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis* aparecieron como grupos hermanos, pero este clado tampoco tuvo un valor de bootstrap alto y su probabilidad posterior en el análisis bayesiano fue baja. Esto sugiere que los tres grupos se diferenciaron rápidamente, lo que se ve claramente en los filogramas que muestran que los tres clados están conectados por ramas internas muy cortas.

Análisis de color

La mayoría de los espectros de color que obtuve de los parches de plumajes medidos no presentaron picos marcados, por lo que puede afirmarse que la coloración presentada por los distintos individuos varía dentro de un mismo color. Sin embargo los análisis

indicaron que existen diferencias marcadas entre *T. nicefori* y *T. rufalbus*, y diferencias menores entre las subespecies *T. r. cumanensis* y *T. r. minlosi*.

Con relación a la intensidad de color en cada segmento de absorción (R, G, B y Y), el análisis de componentes principales logró reducir las 20 variables iniciales a cinco componentes principales que explican el 84% de la variación total. El CP1 explica el 37% de la variación y se correlaciona positivamente con las variables espalda- Q_G (0.841) y flanco- Q_G (0.876) y negativamente con las variables flanco- Q_R (-0.833) y espalda- Q_R (-0.796). Ambos segmentos representan la intensidad de luz reflejada entre 415 – 509 nm (Q_G) y 605 – 700 nm (Q_R). El CP2 explica el 22% de la variación y se relaciona positivamente con las variables cuello- Q_Y (0.909) y flanco- Q_Y (0.861) y negativamente con las variables flanco- Q_B (-0.906) y cuello- Q_B (-0.766). El CP3 y CP4 explican el 10.8% y 8.6%, respectivamente (Fig. 5 y 6, Anexo 1). Este análisis reveló una notable diferencia en el color entre las dos subespecies de *T. rufalbus* y *T. nicefori* en el CP1 (Figura 5). Individuos con menores valores del CP1 (los correspondientes a las dos subespecies de *T. rufalbus*) reflejan una menor intensidad de luz entre 415 – 509 nm y una mayor intensidad de luz entre 605 – 700 nm en espalda y flancos (i.e., café mas puro y mas rojizo). Individuos con valores mayores a lo largo del CP1 (*T. nicefori* y un individuo excepcional de *T. rufalbus cumanensis*) reflejan una mayor intensidad entre 415 – 509 nm y una menor intensidad entre 605 – 700 nm en flancos y espalda (café con tintes grisáceos y menos rojizo).

Brillo

Los resultados del análisis discriminante basado en datos de brillo se presentan en la Figura 7. La función discriminante 1 es la que mejor explica la variación entre grupos (83%) y permite separar claramente a *T. nicefori* de las dos subespecies de *T. rufalbus*. Las variables espalda Q_G y cabeza- Q_G tienen los mayores coeficientes positivos para esta función, mientras que la variable cuello- Q_G tiene el mayor coeficiente negativo. Estas variables se refieren a la intensidad de luz reflejada entre 415 – 509 nm y posiblemente se refieren a variaciones en la saturación de café en la cabeza y espalda y el blanco en el cuello. Adicionalmente, la función discriminante 2, asociada con las variables cabeza- Q_B (-1.110), flanco- Q_B (1.164), y flanco- Q_Y (1.559), separa a *T. r. minlosi* de *T. r. cumanensis*, explicando el 17% de la variación (Anexo 2). Según los resultados de clasificación del análisis discriminante, todos los individuos de *T. nicefori*

y *T. r. minlosi* son totalmente distinguibles. En el caso de *T. r. cumanensis* el 78% de los individuos (7 especímenes) pudo diferenciarse, pero la coloración del 22% restante (2 individuos) se asemeja a la de especímenes de *T. r. minlosi*.

Croma

Igual que con los resultados de brillo, con los datos de croma se encontraron diferencias entre *T. nicefori*, *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis*. La función discriminante 1, que explica el 88% de la variación y está asociada con la coloración del área de la espalda (Anexo 3), separó notoriamente los tres grupos (Figura 8). La función discriminante 2, asociada con la coloración del pecho explica en menor medida la variación de los tres grupos (12%). Según los resultados de clasificación del análisis discriminante, la coloración de todos los individuos de *T. nicefori* y *T. r. minlosi* es totalmente distinguible. En el caso de *T. r. cumanensis* el 78% de los individuos pudo diferenciarse, pero la coloración del 22% restante se asemeja a la de especímenes de *T. r. minlosi*.

Tono

Los resultados del análisis discriminante que realicé con los valores de tono, muestran que la separación de los tres grupos no es tan amplia como lo fue con los valores de brillo y croma (Figura 9). Sólo el 64% de los individuos de *T. nicefori*, que corresponden a siete de los 11 especímenes analizados, son asignados por la función discriminante a este taxón. El patrón de coloración del 36% restante, se confunde con los individuos de *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis* (27% y 9% respectivamente). *T. r. minlosi* es distinguible en un 73%, y el 27% restante se asemeja a *T. r. cumanensis*. Por su parte, los individuos de *T. r. cumanensis* se distinguen en un 67%. De acuerdo a las variables que explican la variación de los tres grupos, la función discriminante 1 está relacionada con la espalda (Anexo 3), explica el 81% de la variación, y separa parcialmente a *T. nicefori* de las dos subespecies de *T. rufalbus*.

Análisis morfológicos

El análisis de varianza muestra que existen diferencias significativas entre *T. nicefori*, *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis*, en cuatro de las seis partes del cuerpo medidas (Tabla 3). Para saber entre qué grupos había diferencias para cada variable, realicé la prueba de Tukey. Encontré que *T. nicefori* presenta un pico de mayor longitud que las dos subespecies de *T. rufalbus*, y ésta fue la única diferencia consistente entre las dos

especies reconocidas por la taxonomía actual, ya que en otras variables *T. nicefori* difirió de una subespecie de *T. rufalbus* pero no de la otra. Por su parte, *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis* difieren significativamente en la longitud de la cola y el ancho del pico (Tabla 3). Las medidas del tarso y el ala no mostraron diferencias significativas entre los tres taxones en el ANOVA, por lo que no fue necesario realizar la prueba de Tukey.

Los resultados del análisis discriminante (Figura 10), muestran que *T. nicefori* y *T. rufalbus* son claramente distinguibles. El total de individuos de *T. nicefori* y *T. r. minlosi* son 100% distinguibles, mientras un 80% de los especímenes de *T. r. cumanensis* son distintivos para este taxón. Las variables que mejor explican las diferencias entre grupos son la longitud del pico desde la narina (función discriminante 1, 92.8%), y la longitud del ala cuerda (función discriminante 2, 7.2%) (Anexo 4).

5. DISCUSIÓN

Thryothorus nicefori fue descrito por Meyer de Schauensee (1946) como una nueva especie por sus aparentemente marcadas diferencias de coloración con *T. rufalbus*, pero el análisis de este autor no comprendió estudios cuantitativos. Sin embargo, *T. nicefori* fue considerada en ese momento como una especie válida, situación que sólo comenzó a cuestionarse cuando Ridgely & Tudor (1989) y Collar et al. (1992) sugirieron que este taxón podría en realidad ser una subespecie de *T. rufalbus*. En este estudio realicé análisis cuantitativos para medir objetivamente las diferencias del patrón de coloración, comparaciones morfométricas como una forma adicional de examinar la variación morfológica y análisis moleculares para establecer las relaciones filogenéticas y grado de diferenciación genética entre *T. nicefori* y las subespecies colombianas de *T. rufalbus*. El uso de varias fuentes de información diferentes permite que la evaluación del estado taxonómico de *T. nicefori* sea lo más objetiva posible, dados los múltiples debates en torno a la parte práctica de la delimitación de especies (Sites & Marshall 2003, De Queiroz 2005).

Mis resultados indican que *Thryothorus nicefori* es un taxón totalmente diagnosticable con respecto a *T. rufalbus*. Por medio de los análisis morfológicos encontré variaciones marcadas tanto en coloración de plumaje como en tamaño del pico entre las dos

especies, y según la evidencia molecular, *T. nicefori*, *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis* son tres grupos recíprocamente monofiléticos. Esto implica que estos tres grupos deben haber permanecido aislados por un tiempo considerable para alcanzar diferenciación morfológica y monofilia recíproca. Por lo tanto, es indudable que *T. nicefori* y las subespecies colombianas de *T. rufalbus* son unidades evolutivas independientes, que representan segmentos de linajes a nivel poblacional. Por esta razón, y con base en la definición ontológica del concepto de especie de De Queiroz (2005), claramente *T. nicefori* es una especie válida.

¿Qué tanto debe diferenciarse *T. nicefori* de *T. rufalbus* para que en la práctica se le considere como una especie válida de acuerdo a los criterios ampliamente empleados en taxonomía de aves? Los dos conceptos (o criterios, según de Queiroz 2005) de especie más aceptados por los ornitólogos son el filogenético (CFE, Cracraft 1989) y el biológico (CBE, Johnson et al. 1999). El CFE propone que las especies son cualquier grupo de organismos que comparten al menos un único carácter derivado o apomórfico. Es un concepto ampliamente usado y aplicable en poblaciones alopátricas (Agapow et al 2004). Debido a que *T. nicefori* es diagnosticable morfológica y genéticamente con respecto a *T. rufalbus*, bajo el CFE es claro que este taxón es una especie válida.

El CBE propone que las especies son grupos o poblaciones de individuos que pueden cruzarse entre sí, pero que están aislados reproductivamente de otros grupos afines, por lo que constituyen un linaje evolutivo separado y reforzado por una serie de barreras que pueden ser tanto geográficas como biológicas (Johnson et al. 1999; Agapow et al 2004). Aunque mis resultados de análisis de coloración y morfometría sugieren que las poblaciones de *T. rufalbus* y *T. nicefori* son estadísticamente distinguibles con base en sus fenotipos, y mis análisis genéticos muestran que también son distinguibles genéticamente, es imposible asegurar con total certeza que existen mecanismos que impiden el flujo genético entre *T. nicefori* y *T. rufalbus*, ya que las diferencias podrían ser el resultado simplemente de aislamiento geográfico. Mediante mi trabajo de campo, el cual comprendió gran parte de la distribución de *T. rufalbus* y todo el rango de *T. nicefori* (Hilty & Brown, 1986; Parra et al 2005), no localicé poblaciones simpátricas y las encontradas resultaron estar separadas por más 100 km (Figura 1), lo que me lleva a concluir que *T. nicefori* y *T. rufalbus* tienen distribuciones alopátricas. Por esta razón, determinar con base en mis resultados si *T. rufalbus* y *T. nicefori* son especies distintas

de acuerdo al CBE, es difícil debido a que no es posible asegurar si las diferencias existentes pueden mantenerse en un momento en el cual ambas poblaciones se encuentren (Helbig et al. 2002).

Debido a las distribuciones alopátricas de *T. nicefori* y *T. rufalbus*, para poder determinar qué tan significativas son las diferencias desde una perspectiva taxonómica, resultan importantes los resultados que demostraron que las diferencias morfológicas entre *T. nicefori* y *T. rufalbus* exceden las diferencias existentes entre subespecies de *T. rufalbus*. Patrones de variación de este tipo son frecuentemente interpretados para apoyar el reconocimiento de especies diferentes por parte de ornitólogos que utilizan el CBE (Helbig et al. 2002, Renssen 2005). Con los análisis morfométricos y de color, demostré que las dos subespecies de *T. rufalbus* no mostraron diferencias en muchas de las variables analizadas, mientras que las diferencias entre individuos de *T. nicefori* y *T. rufalbus* generalmente fueron muy marcadas y en su mayoría superiores a las diferencias entre *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis*. En resumen, podría decirse que el fenotipo de las poblaciones de *T. nicefori* se encuentra fuera del rango de variación que existe dentro y entre subespecies o poblaciones de *T. rufalbus*, siendo justificable considerar a *T. nicefori* como una especie diferente (Renssen 2005, Helbig et al. 2002).

Aunque en la práctica es imposible demostrar que *T. nicefori* y *T. rufalbus* son especies aisladas reproductivamente por no tratarse de poblaciones simpátricas, con los datos obtenidos puede sugerirse que es posible que ya se hayan formado barreras al flujo entre estas poblaciones que las mantendrían como especies independientes en la eventualidad de que se encontraran en el mismo espacio geográfico. Por una parte, se ha demostrado que la coloración del plumaje en muchas aves es bastante importante en la escogencia de parejas (Endler 2005), por lo que es posible que las variaciones en el patrón de color entre *T. rufalbus* y *T. nicefori* les confieran aislamiento reproductivo. Adicionalmente, Valderrama *et al* (en revisión) analizaron la variación de las vocalizaciones de *T. rufalbus* y *T. nicefori*, y encontraron que existen diferencias entre estos dos taxones en las frecuencias, tono y duración de sus cantos. En vista de que en las aves la comunicación acústica juega un papel clave en la escogencia y reconocimiento de parejas (Renssen 2005), estos datos apoyarían la idea de que *T. nicefori* y *T. rufalbus* son dos especies distintas que se encuentran aisladas reproductivamente. Sin embargo, hace falta demostrar que las variaciones morfológicas documentadas en este estudio y

las variaciones en vocalizaciones encontradas por Valderrama et al. (en revisión) son perceptibles por los individuos en el campo a la hora de seleccionar sus parejas. De hecho, en el caso específico del canto, he observado que los individuos de *T. rufalbus* responden a las vocalizaciones de *T. nicefori*, lo que indicaría que las diferencias notadas por Valderrama et al. (en revisión) podrían no ser tan importantes como barreras de flujo genético entre esta especies.

Aunque las diferencias encontradas entre las dos subespecies de *T. rufalbus* no fueron significativas en algunas de las variables analizadas, hubo algunas en las que sí se presento una variación considerable, y las subespecies pudieron ser distinguidas en análisis multivariados de la coloración y la morfometría. Teniendo en cuenta que estas dos poblaciones han estado aisladas por un periodo de tiempo considerable (sugerido por su monofilia recíproca) y tienen distribuciones apartadas, resulta necesario realizar estudios más detallados para determinar si sería conveniente considerarlas especies diferentes.

Es claro que *T. nicefori*, *T. rufalbus minlosi* y *T. r. cumanensis* son grupos recíprocamente monofiléticos, pero no fue posible establecer con claridad la relación precisa entre estos tres taxones. Tal vez como resultado de una rápida diferenciación las relaciones entre los tres clados no puedan ser resueltas (Cadena et al. en imprenta). Sin embargo, es probable que añadiendo secuencias de más genes se logre resolver la politomía.

Mayr (1946, 1964) propuso que la familia Troglodytidae tuvo un origen en Norteamérica y posteriormente se diversificó en Centro y Suramérica. Ningún investigador intentó poner a prueba esta hipótesis hasta Barker (2004), pero debido a que las relaciones entre géneros de la familia no pudieron ser establecidas claramente en este estudio, no pudieron alcanzarse conclusiones biogeográficas claras. Posteriormente, Barker (2007) realizó un estudio del género *Campylorhynchus* y comprobó que éste si tuvo un origen en Norteamérica y una posterior dispersión hacia Suramérica. Es posible que un origen norteamericano seguido por gran diversificación en Suramérica se aplique también al clado que incluye las especies suramericanas de *Thryothorus* (ver Mann et al. 2006). En el caso específico de *T. rufalbus*, de igual forma podría sugerirse el mismo patrón de dispersión. Con la formación del istmo de Panamá, se abrió la posibilidad de

colonizar la parte norte del continente suramericano, lo cual puede verse reflejado en una mayor diversificación de *T. rufalbus* en el área de Centroamérica, a diferencia de los pocos linajes evolutivos que se mantienen en Suramérica, posiblemente por un poco tiempo de diversificación. En un futuro espero combinar mis resultados con secuencias de especímenes colectados a través de todo el rango de distribución de *T. rufalbus* desde México hasta Colombia y Venezuela, para poder elucidar de manera más completa la historia evolutiva de todo el grupo.

6. CONCLUSIONES

Mis análisis muestran que *T. rufalbus* y *T. nicefori* son dos linajes distintivos que han evolucionado de forma aislada, alcanzando una serie de características que los hacen completamente distinguibles entre sí (De Queiroz 2005). Sus diferencias diagnósticas en plumaje y medidas morfométricas, así como un período considerable de evolución independiente sugerido por su monofilia recíproca, sugieren que *T. rufalbus* y *T. nicefori* son dos especies válidas filogenéticamente hablando. Sin embargo, aplicando el concepto biológico de especie no es posible afirmar que ambos taxones se mantendrán aislados reproductivamente a futuro, pues no se ha comprobado que los individuos reconocen las diferencias encontradas, por lo que no es claro si éstas representan barreras al flujo genético. De cualquier manera, los datos obtenidos en este estudio y los de Valderrama et al. (en revisión) son enteramente consistentes con la hipótesis que está implícita en la taxonomía actual de las aves de Suramérica (Remsen et al. 2007) de que *T. nicefori* es una especie diferente de *T. rufalbus*. Por lo tanto, concluyo que *T. nicefori* debe seguir siendo considerada una especie válida.

En este estudio se abordó un caso en el que la ausencia de datos cuantitativos que permitieran adoptar criterios taxonómicos claros había impedido una evaluación taxonómica rigurosa de un taxón endémico y críticamente amenazado. Los resultados permiten disipar las dudas acerca del estado taxonómico de *T. nicefori*: este taxón corresponde a una especie válida, por lo que debe seguir siendo considerado un taxón con alta prioridad de conservación. Disipadas las dudas en cuanto a la validez de *T. nicefori*, se hace patente la necesidad de preservar esta pequeña población que habita los valles secos del Cañón del Chicamocha. Resulta inminente la puesta en marcha de proyectos que tengan como objetivo el mantenimiento y regeneración de los ambientes

nativos de la región, con el objetivo de poder mantener poblaciones de *T. nicefori* y otras especies amenazadas que comparten su hábitat.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agapow, P.-M., Bininda-Emonds, O. R. P., Crandall, K. A., Gittleman, J. L., Mace, G. M., Marshall, J. C. & Purvis, A. 2004 The impact of species concept on biodiversity studies. *Q. Rev. Biol.* **79**, 161–179.

Altekar, G., S. Dwarkadas, J. P. Huelsenbeck, and E. Ronquist. 2004. Parallel Metropolis coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference. *Bioinformatics* **20**:407-415.

Barker, F. K. 2004. Monophyly and relationships of wrens (Aves: Troglodytidae): a congruence analysis of heterogeneous mitochondrial and nuclear DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **31**: 486-504.

Barker, F.K. 2007. Avifaunal interchange across the Panamanian Isthmus: insights from *Campylorhynchus* wrens. *Biological Journal of the Linnean Society* **90**: 687-702.

Bates, J.M., Bowie, R.C.K., Willard, D.E, Voelker, G. and Kahindo, C. 2004. A need for continued collecting of avian voucher specimens in Africa: Why blood is not enough. *Ostrich*. **75**: 187-191

BirdLife International. 2000. Threatened birds of the World. Cambridge, UK: Lynx Editions & BirdLife International.

Cadena, C.D., 2003. Taxonomía de *Cistothorus apolinari* (Troglodytidae), conceptos de especie y conservación de las aves amenazadas de Colombia: Un Comentario. *Ornitología Colombiana* Nº1 :71-75.

Cadena, C. D., J. Klicka & R. E. Ricklefs. Evolutionary differentiation in the Neotropical montane region: molecular phylogenetics and phylogeography of *Buarremon* brush-finches (Aves, Emberizidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, en imprenta.

Cracraft, J. 1989. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. Págs. 28-59 en: D. Otte & J. A. Endler (eds.). Speciation and its consequences. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

De Queiroz, K. 2005. A unified concept of species and its consequences for the future taxonomy. Proceedings of the California Academy of Sciences. Vol. 56, No. 18, pp 196-215.

De Queiroz, K. 1999. The general lineage concept of species and the defining properties of the species category. Págs 49-89 en: R. A. Wilson (ed.). Species: new interdisciplinary essays. MIT Press, Cambridge, Mass.

Endler, J.A. 1990. On the measurement and classification of color in studies of animal color patterns. Biological journal of the Linnean Society vol: 41 iss: 4 pg: 315 -352.

Endler, J.A. & P. W. Mielke, JR. 2005. Comparing entire colour patterns as birds see them. Biological journal of the Linnean Society vol: 86 iss: 4 pg: 405 -431.

Franco-Maya, A. M. y G. A. Bravo. 2005. Áreas importantes para la conservación de las aves en Colombia. Pp: 117-281. En Áreas importantes para la conservación de las aves en los Andes tropicales; sitios prioritarios para la conservación de la biodiversidad. K. Boyla y A. Estrada (Eds.). BirdLife Internacional y Conservación Internacional. Serie de Conservación de BirdLife No. 14. Quito, Ecuador.

Helbig, A. J., A. G. Knox, D. T. Parkin, G. Sangster & M. Collinson. 2002. Guidelines for assigning species rank. Ibis 144: 518-525.

Hilty, S. L. & W. L. Brown. 2001. Guía de las aves de Colombia. American Bird Conservancy-ABC, Colombia.

Hoekstra, H., Krenz, JG. & Nachman MW. 2005. Local adaptation in the rock pocket mouse (*Chaetodipus intermedius*): natural selection and phylogenetic history of populations. *Heredity* 94, 217–228

Johnson, N. K., J. V. Remsen JR. & C. Cicero. 1999. Resolution of the debate over species concepts in ornithology: a new comprehensive biologic species concept. Págs. 1470-1482 en: N. J. Adams & R. H. Slotow (eds.). Proc. 22 Int. Ornithol. Congr., BirdLife South Africa, Johannesburg.

Johnson, J. A., Watson, R. T. & D. Mindell. 2005 Prioritizing species conservation: does the Cape Verde kite exist? *Proc. R. Soc. B*(2005) 272, 1365–1371.

Mann, N. I., Barker F. K., Graves J. A. , Dingess-Mann K. A. & Slater P. J.B. 2006. Molecular data delineate four genera of “*Thryothorus*” wrens. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2006.

Meyer De Schauensee, R. 1946. A new species of wren from Colombia. *Notulae Naturae* 161: 1-14.

Mundy, N. I., Unitt, P. & D. S. Woodruff. 1997 Skin From Feet of Museum Specimens as a Non-destructive Source of DNA for Avian Genotyping. *The Auk* 114(1):126-129.

Posada, D and T. R. Buckley. 2004. Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches Over Likelihood Ratio Tests. *Systematic Biology*. 53(5): 793-808

Posada, D., and K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818.

Parra J., N. Dávila, M. Beltrán, A. Delgadillo. 2005- The conservation of two Critically Endangered dry forest birds; Niceforo’s Wren and Chestnut-bellied Hummingbird. Final Report: research activities and results. Fundación ProAves, Colombia.

- Remsen, J.V., Jr.**, 1995. The importance of continued collecting of bird specimens to ornithology and bird conservation. *Bird Conservation International* 5: 145-180
- Remsen, J.V.**, 2005. Pattern, process, and rigor meet classification. *The Auk* 122(2):403-413.
- Remsen, J. V., Jr., C. D. Cadena, A. Jaramillo, M. Nores, J. F. Pacheco, M. B. Robbins, T. S. Schulenberg, F. G. Stiles, D. F. Stotz, and K. J. Zimmer.** Version [2007]. A classification of the bird species of South America. American Ornithologists' Union. <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html>. Consultada el 26 de Junio de 2007
- Renjifo, L. M., A. M. Franco-Maya, J. D. Amaya-Espinel, G. H. Catan & B. Lopez-Lanus (eds.)**. 2002. Libro rojo de aves de Colombia. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt y Ministerio del Medio Ambiente, Colombia.
- Ridgely, R., G. Tudor, & W. L. Brown.** 1989. *The Birds of South America*, vol. 1. University of Texas Press, Austin
- Rojas, M.** 1992. The species problem and conservation: what are we protecting? *Conservation Biology* 6: 170-178.
- Rosenblum, E. B.** 2006. Convergent Evolution and Divergent Selection: Lizards at the White Sands Ecotone. *The American Naturalist*. Vol 167, pp 1-15
- Sites J.W. & Marshall, J.C.** 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution* Vol.18 No.9
- S Kumar, K Tamura, and M Nei** 2004. MEGA 3.1: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.

Sorenson, M. D., J. C. Ast, D. E. Dimcheff, T. Yuri, and D. P. Mindell. 1999. Primers for a PCRbased approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **12**:105-114.

Valderrama, S., Parra, J. & D. J. Mennill. Species Differences in the song of the critically endangered Niceforo's wren *Thryothorus nicefori* and the related Rufous-and-White wren *Thryothorus rufalbus*. *En revisión*

Valderrama, S. V. 2005. Contribución al conocimiento de la historia natural, ecología y hábitat del Cucarachero de Nicéforo en un enclave seco del municipio de San Gil (Santander). Tesis de pregrado. Universidad de los Andes, Bogotá

Tabla 1. Información de localidades de colecta y número de catalogo de museos, para los especímenes incluidos en los análisis morfológicos y genéticos. †Especímenes usados solamente en análisis genéticos, **Especímenes usados en análisis genéticos y morfológicos. *Especímenes usados solo en análisis morfológicos.

Taxón	Departamento	Localidad	Museo	No. de Catalogo
<i>Thryothorus nicefori</i> **	Santander	Municipio Florida Blanca, Vereda Los Helechales	ICN	KV 001
<i>Thryothorus nicefori</i> **	Santander	Municipio Florida Blanca, Finca La Esperanza	ICN	36027
<i>Thryothorus nicefori</i> **	Santander	Municipio Florida Blanca, Finca La Esperanza	ICN	KV 002
<i>Thryothorus nicefori</i> **	Santander	Municipio Curití, Vereda Maaregua Rincón, La Cueva	ICN	36236
<i>Thryothorus nicefori</i> *	Santander	San Gil	La Salle	5-361
<i>Thryothorus nicefori</i> *	Santander	San Gil	La Salle	5-362
<i>Thryothorus nicefori</i> *	Santander	San Gil	La Salle	5-363
<i>Thryothorus nicefori</i> **	Santander	Municipio Curití, Vereda Maaregua Rincón	Los Andes	KV006
<i>Thryothorus nicefori</i> †	Santander	Municipio Jordán, Vereda elPotero-La Peña	N. A	KVP010
<i>Thryothorus nicefori</i> †	Santander	Municipio Barichara, Vereda Butaregua, Resumidero	N.A	KVP017
<i>Thryothorus nicefori</i> †	Santander	Florida Blanca, Finca La Esperanza	N.A	KVP018
<i>Thryothorus rufalbus cumanensis</i> *	Magdalena	Santa Marta, Minca, Finca elRecuerdo	ICN	2140
<i>Thryothorus rufalbus cumanensis</i> **	Córdoba	Municipio Loricá, Vereda Ceiba Pareja, La Montañita	ICN	34936
<i>Thryothorus rufalbus cumanensis</i> **	Córdoba	Municipio Loricá, Vereda Ceiba Pareja, La Montañita	ICN	34937
<i>Thryothorus rufalbus cumanensis</i> **	Cesar	Valledupar, Reserva Natural los Besotes	Los Andes	KV008
<i>Thryothorus rufalbus cumanensis</i> **	Cesar	Valledupar, Reserva Natural los Besotes	Los Andes	KV009
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> *	Cundinamarca	Ubalá	ICN	35943
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> *		San Carlos de Guevara	ICN	11865
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> *	Boyacá	Vereda Suna	ICN	3444
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> *	Meta	San Martín	ICN	3443
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> *	Meta	San Martín	ICN	23162
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> *	Boyacá	Miraflores, Vereda Suna	ICN	3445
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> *	Meta	Villavicencio	ICN	18869
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> **	Meta	Cubarral, Vereda el Vergel, Escuela	ICN	32728
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> **	Meta	Acacias	ICN	32498
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> **	Cundinamarca	Ubalá, Río Saguzá, Vereda Soya	ICN	33130
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> **	Meta	Villavicencio, Río Guatiguía	ICN	32127
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> **	Meta	Villavicencio, Jardín Botánico	ICN	34828
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> *	Boyacá	Corregimiento de Paez, Vereda el Tunjo	ICN	13962
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> *	Boyacá	Corregimiento de Paez, Vereda el Tunjo	ICN	13963
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> *	Meta	Cubarral	ICN	19863
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> *	Meta	Restrepo, Universidad Tecnológica del Llano	ICN	30644
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> *	Meta	Cubarral	ICN	19862
<i>Thryothorus rufalbus minlosi</i> †	Norte de Santander	Cúcuta	ICN	28822

Tabla 2. Valores no corregidos de la divergencia de las secuencias (distancia p). Los valores corresponden al promedio y desviación estándar, dentro y entre los tres taxones.

	<i>T. nicefori</i>	<i>T. r. cumanensis</i>	<i>T. r. minlosi</i>
<i>T. nicefori</i>	0.16 (0.0016)		
<i>T. r. cumanensis</i>	3.14 (0.0010)	0.000 (0.000)	
<i>T. r. minlosi</i>	3.73 (0.0019)	3.01 (0.0011)	0.2 (0.0019)

Tabla 3. Medidas morfométricas (mm) de adultos de *T. nicefori*, *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis* y los resultados de análisis de varianza y pruebas de tukey. Los valores corresponden al tamaño de la muestra, la media y la desviación estándar. N = *T. nicefori*, C = *T. r. cumanensis* y M = *T. r. minlosi*. Las líneas que los conectan las letras, indican que no existen diferencias significativas entre grupos.

Parámetro	<i>T. nicefori</i>	<i>T. r. cumanensis</i>	<i>T. r. minlosi</i>	ANOVA	Tukey
N	8	5	15		
Culmen Total	23.02 \pm 1.20	21.38 \pm 1.22	21.30 \pm 0.83	p = 0.002	N C M --- -----
Longitud pico desde la narina	14.24 \pm 0.66	12.74 \pm 0.30	12.34 \pm 0.49	p < 0.001	N C M --- -----
Ancho pico a la narina	4.5 \pm 0.24	4.47 \pm 0.06	4.23 \pm 0.26	p = 0.025	N C M ----- -----
Tarso	23.27 \pm 0.44	23.91 \pm 0.35	23.54 \pm 0.70	p = 0.186	
Ala	68.51 \pm 2.30	69.19 \pm 1.93	65.88 \pm 3.41	p = 0.047	
Cola	60.84 \pm 2.99	57.20 \pm 2.47	54.66 \pm 3.50	p = 0.001	N C M ----- -----

Figura 1. Sitios de muestreo de las tres poblaciones: *T. nicefori* (Departamento de Santander), *T. r. minlosi* (Departamentos de Norte de Santander, Boyacá, Cundinamarca y Meta) y *T. r. cumanensis* (Departamentos de Córdoba, Cesar y Magdalena).



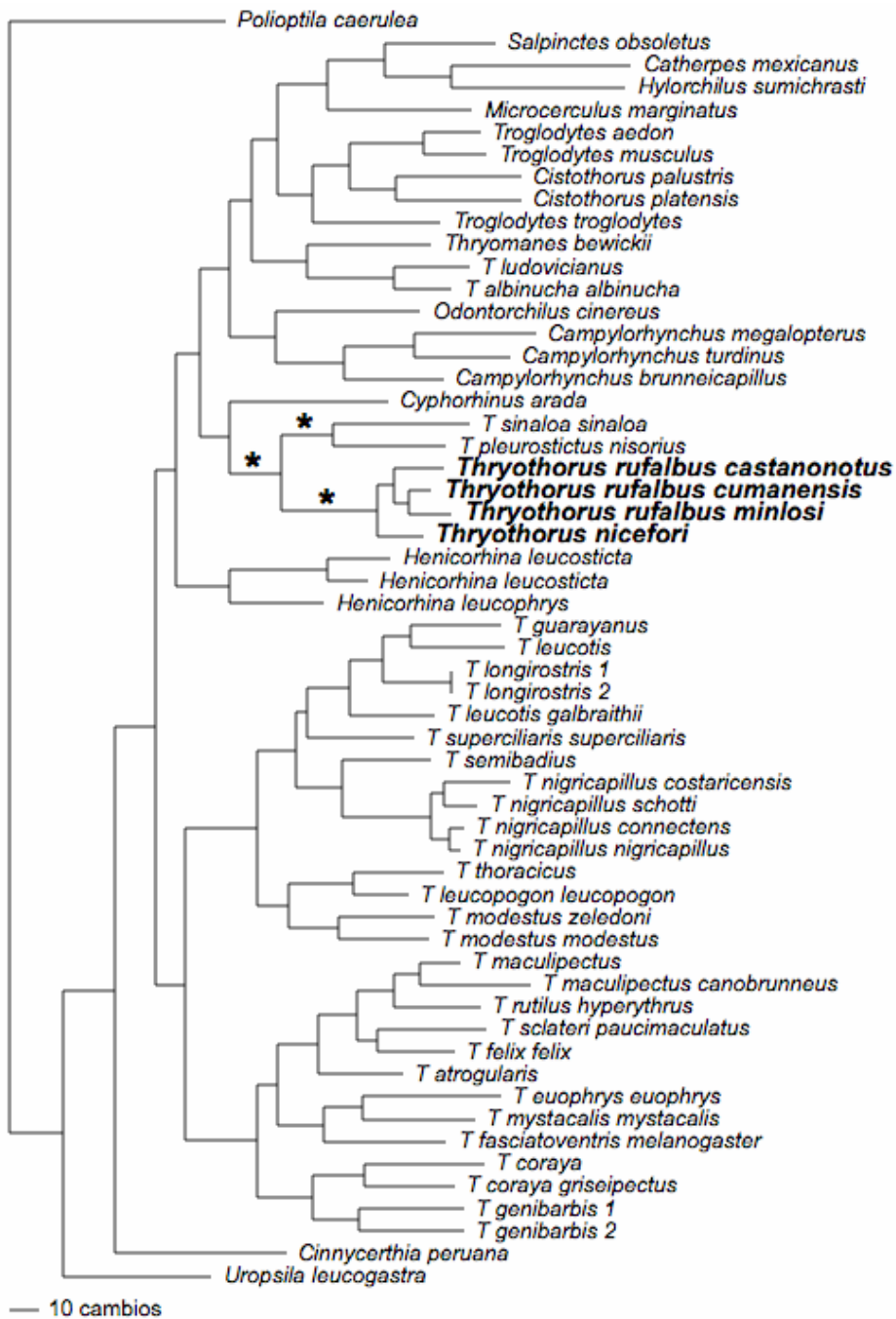


Figura 2: Relación filogenética de *T. nicefori*, *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis* con representantes de todas las especies de *Thryothorus* y géneros de Troglodytidae. Resultados basados en las secuencias del gen mitocondrial *cyt-b*. El filograma muestra el análisis de máxima parsimonia, y * indica un soporte de bootstrap de 100%

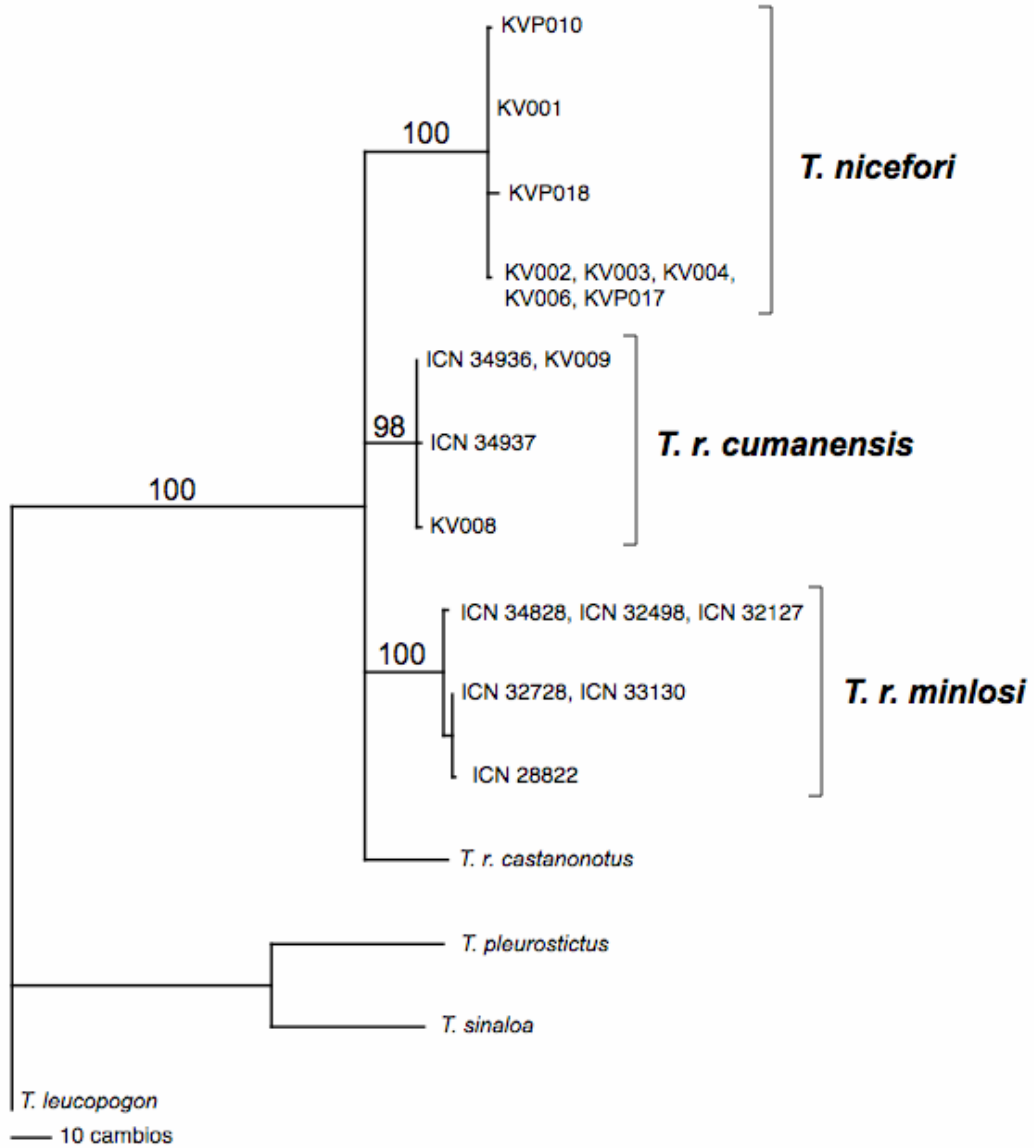


Figura 3: Relación filogenética de *T. nicefori*, *T. r. minlosi*, *T. r. cumanensis* y el grupo externo basados en análisis de máxima parsimonia de las secuencias del gen mitocondrial *cyt-b*. Los números de catálogo corresponden a los especímenes e individuos liberados incluidos en la tabla 1. El filograma muestra unos de los árboles más parsimoniosos, y los valores del bootstrap.

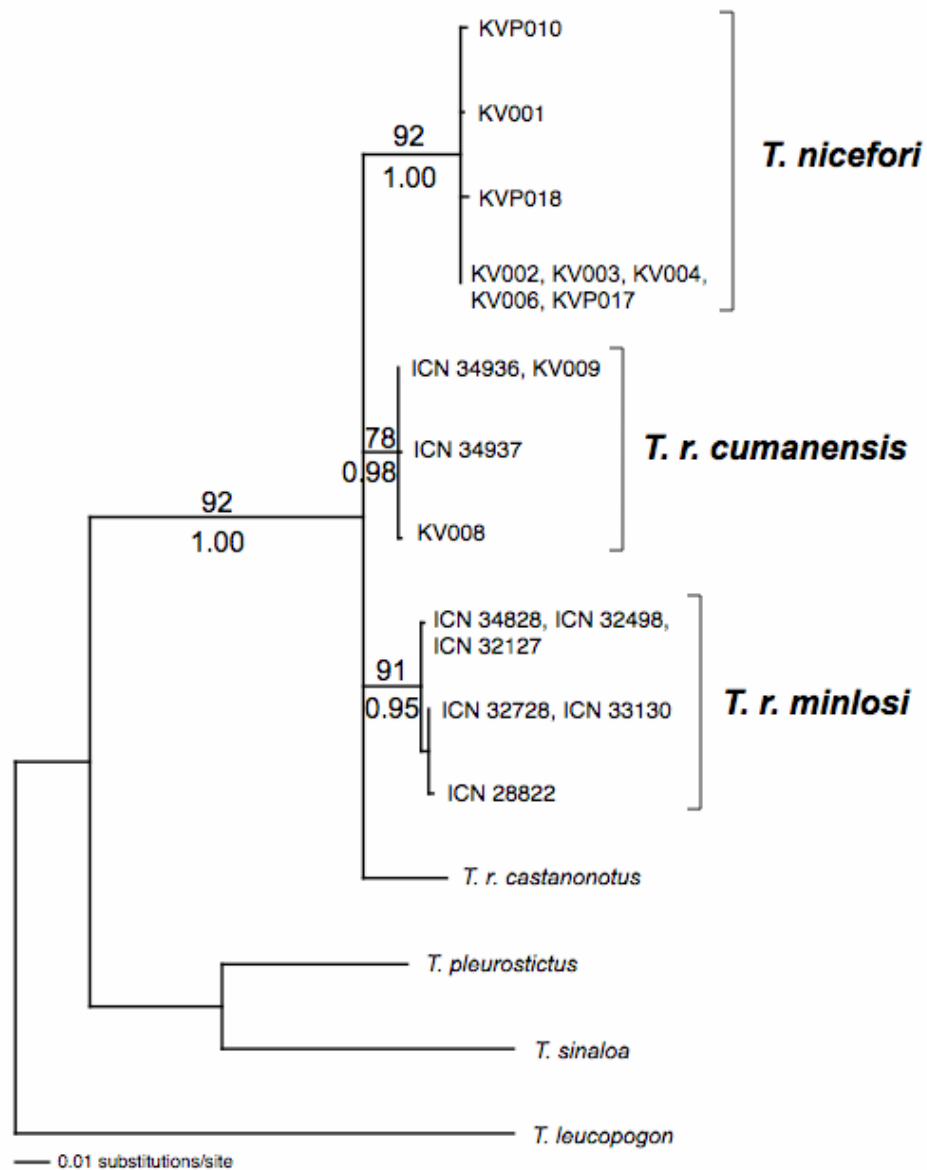


Figura 4: Relación flogenética de *T. nicefori*, *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis* y el grupo externo, basados en análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana. Los números de catálogo corresponden a los especímenes e individuos liberados incluidos en la tabla 1. El soporte de las ramas del filograma, esta dado por la probabilidad posterior y los valores de bootstrap.

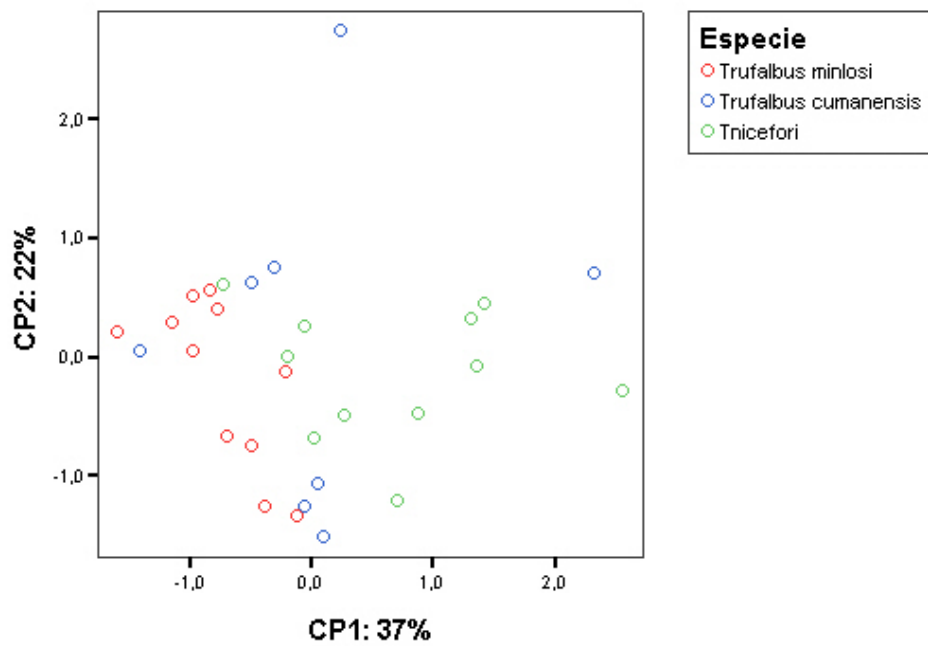


Figura 5: Resultados de análisis de componentes principales (ACP) con los datos obtenidos del espectrofotómetro de las cinco partes del cuerpo analizadas para especímenes de *T. nicefori*, *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis*. Los valores de cada eje, representan el porcentaje de la variación explicada por los dos primeros componentes.

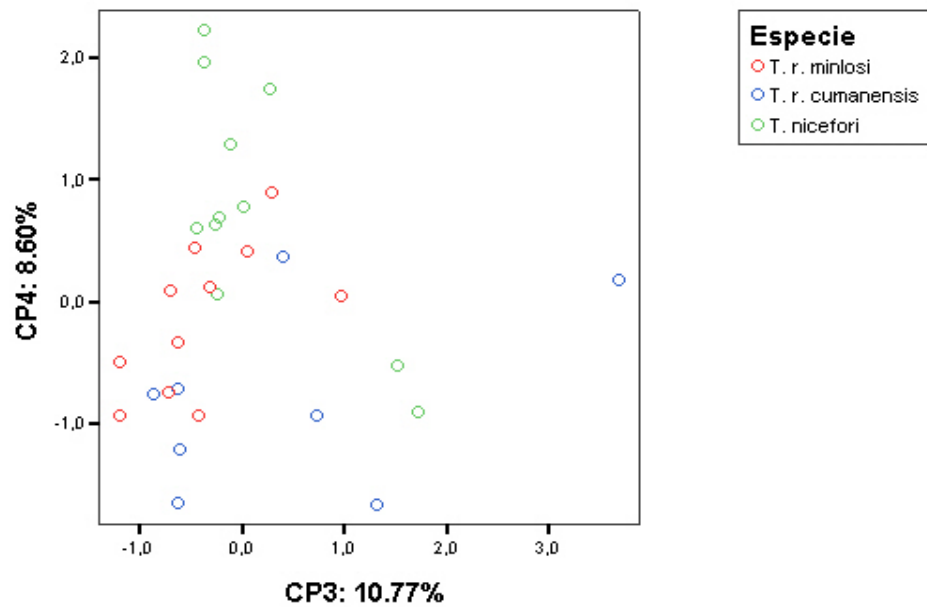


Figura 6: Resultado de análisis de componentes principales (ACP) con los datos obtenidos del espectrofotómetro de las cinco partes del cuerpo analizadas para especímenes de *T. nicefori*, *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis*. Los valores de cada eje, representan el porcentaje de la variación explicada por los componentes tres y cuatro.

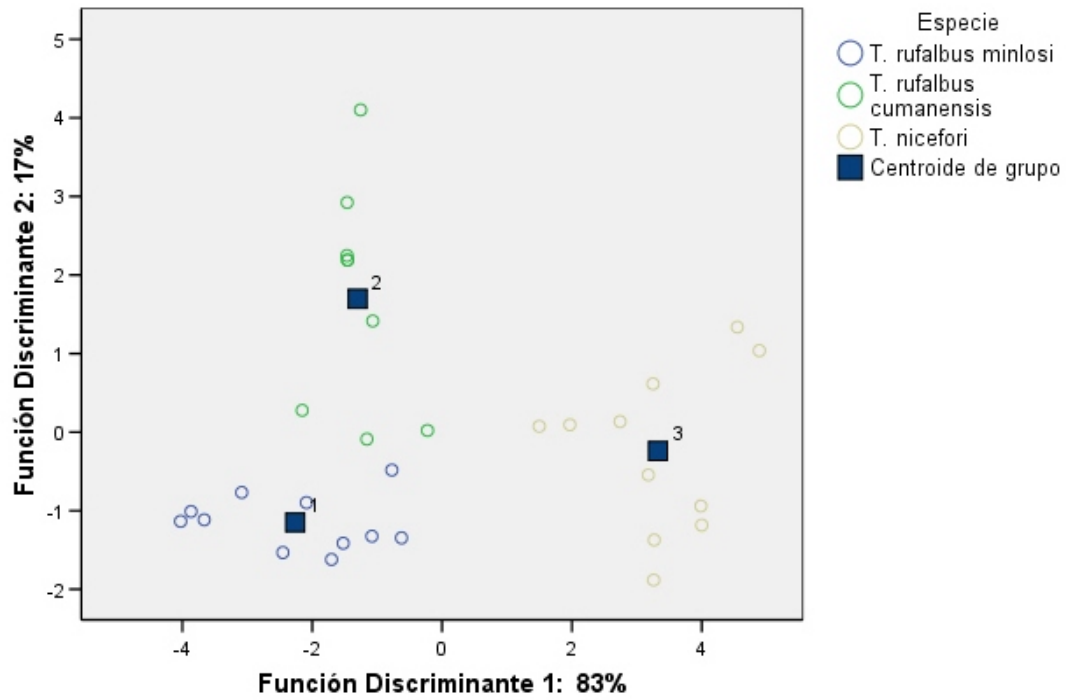


Figura 7: Resultado de análisis discriminante con los datos obtenidos del espectrofotómetro de intensidad relativa (B, G, Y, R) de las cinco partes del cuerpo analizadas para especímenes de *T. nicefori*, *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis*. Los valores de cada eje, representan el porcentaje de la variación explicada por cada función.

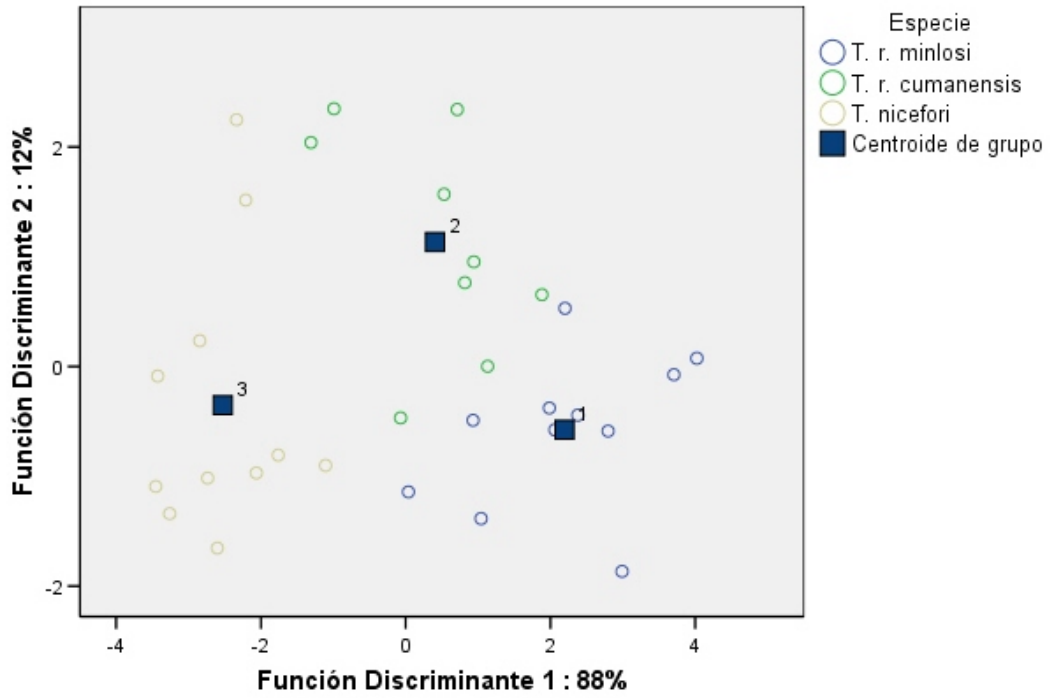


Figura 8: Resultado de análisis discriminante con los datos de Cromo, correspondientes a las cinco partes del cuerpo analizadas para especímenes de *T. nicefori*, *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis*. Los valores de cada eje, representan el porcentaje de la variación explicada por cada función.

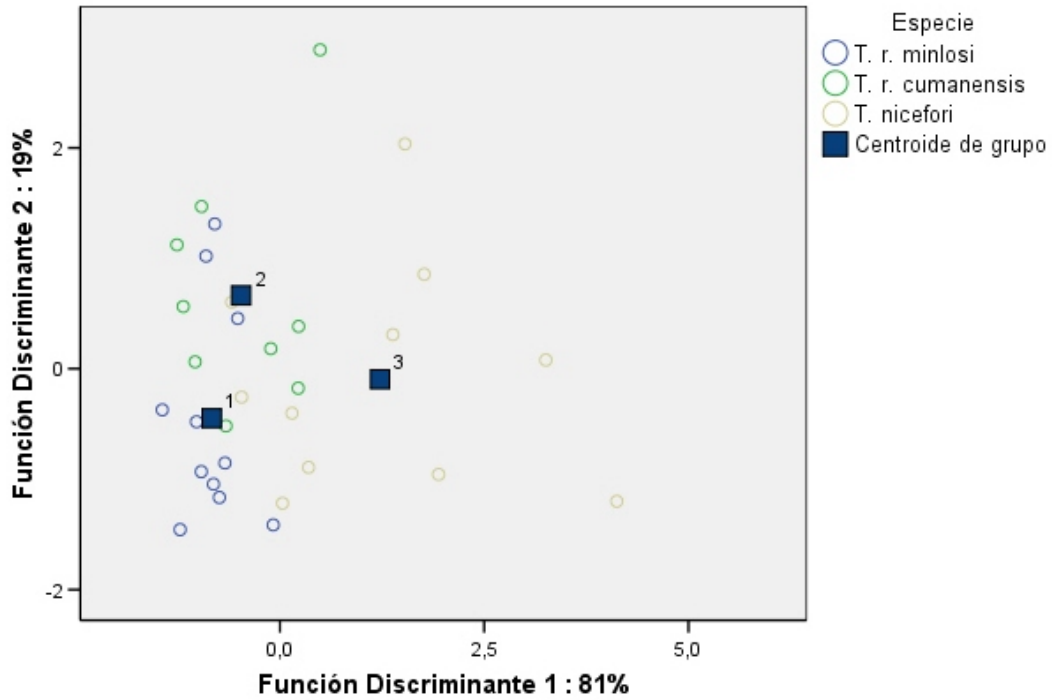


Figura 9: Resultado de análisis discriminante con los datos obtenidos del espectrofotómetro de intensidad relativa (B, G, Y, R) de las cinco partes del cuerpo analizadas para especímenes de *T. nicefori*, *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis*. Los valores de cada eje, representan el porcentaje de la variación explicada por cada función.

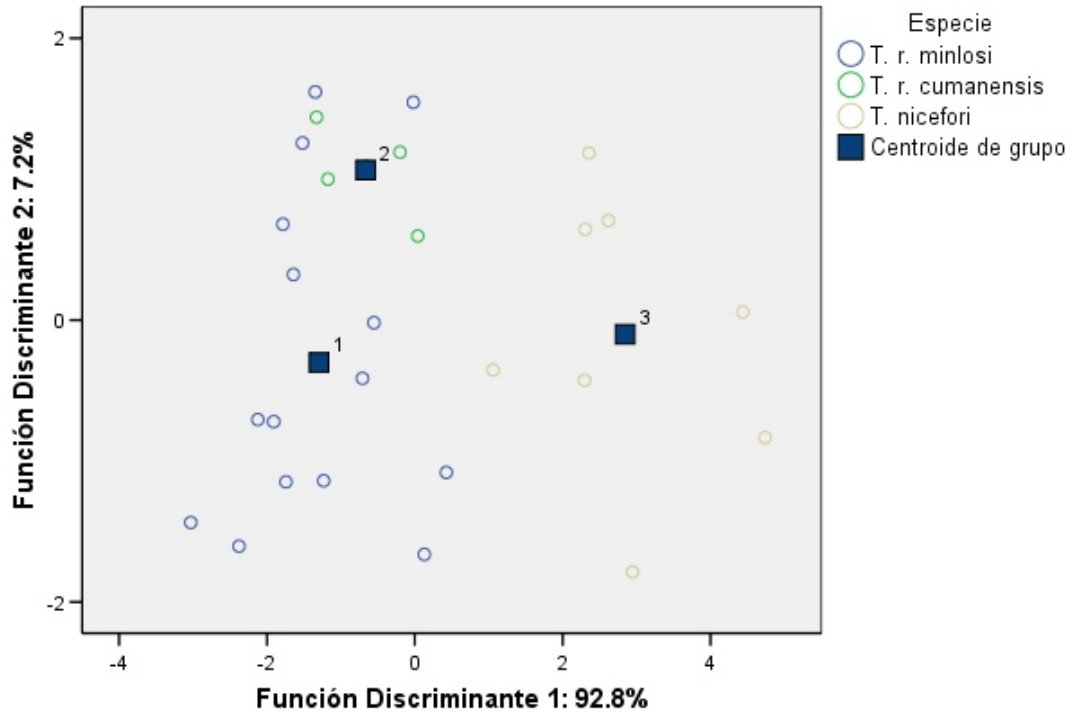


Figura 10: Resultado de análisis discriminante con los datos obtenidos de las medidas morfométricas de las cinco partes del cuerpo analizadas para especímenes de *T. nicefori*, *T. r. minlosi* y *T. r. cumanensis*. Los valores de cada eje, representan el porcentaje de la variación explicada por cada función.

Anexo 1. Resultado del análisis de componentes principales. Se analizaron los valores obtenidos con el espectrofotómetro para las 5 partes del cuerpo con su respectiva intensidad relativa para cada segmento. Donde B = Azul, G = Verde, Y = Amarillo y R = Rojo.

Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales		
	Total	% de la varianza	% acumulado
1	7,342	36,711	36,711
2	4,589	22,946	59,657
3	2,155	10,774	70,431
4	1,722	8,608	79,039
5	1,117	5,583	84,621

Componentes rotados

	Componente				
	1	2	3	4	5
B_pecho	-.247	-.574	-.450	.457	-.096
G_pecho	.344	.005	.845	-.205	-.076
Y_pecho	.301	.581	.333	-.304	.325
R_pecho	-.370	.268	-.790	-.101	-.038
B_cabeza	.228	-.132	.187	.888	.128
G_cabeza	.108	.166	.796	.378	.293
Y_cabeza	-.125	.327	-.002	-.776	.144
R_cabeza	-.178	-.166	-.671	-.531	-.355
B_cuello	.200	-.766	.033	.094	.422
G_cuello	.540	.289	.600	.158	.169
Y_cuello	.111	.909	.078	-.048	.004
R_cuello	-.605	.051	-.477	-.175	-.500
B_espalda	.482	-.025	.172	.482	-.514
G_espalda	.841	.305	.175	.296	-.103
Y_espalda	.018	.202	.239	.002	.825
R_espalda	-.796	-.245	-.227	-.394	.143
B_flanco	-.033	-.906	.055	.065	-.118
G_flanco	.876	.044	.242	-.015	.022
Y_flanco	.068	.861	-.049	-.102	.397
R_flanco	-.833	.261	-.253	.027	-.214

Anexo 2. Resultados del análisis discriminante para los valores de brillo, dados por la intensidad relativa de cada segmento del espectro, según los pigmentos visuales. Donde B = Azul, G = Verde, Y = Amarillo y R = Rojo.

Autovalores

Función	Autovabr	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	6,899(a)	82,5	82,5	,935
2	1,468(a)	17,5	100,0	,771

Coefficientes estandarizados de las funciones discriminantes canónicas

	Función	
	1	2
B_pecho	,334	-,829
G_pecho	-,068	-,574
Y_pecho	,062	-,128
B_cabeza	-,124	-1,110
G_cabeza	1,041	,285
Y_cabeza	-,189	-,386
B_cuello	,269	,499
G_cuello	-1,438	,787
Y_cuello	,211	,219
B_espalda	,483	,916
G_espalda	1,831	-,878
Y_espalda	,405	-,074
B_flanco	,588	1,164
G_flanco	-,201	,555
Y_flanco	-,059	1,559

Anexo 3. Resultados del análisis discriminante para los valores de Cromo y Tono

Autovalores Cromo

Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	4,457(a)	88,3	88,3	,904
2	,592(a)	11,7	100,0	,610

Coefficientes estandarizados de las funciones discriminantes canónicas (Datos Cromo)

	Función	
	1	2
Pecho	-,026	,991
Cabeza	,475	,639
Cuello	,581	-,097
Espalda	1,077	-,198
Flanco	,138	-,509

Autovalores (Tono)

Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	,935(a)	80,7	80,7	,695
2	,224(a)	19,3	100,0	,428

Coefficientes estandarizados de las funciones discriminantes canónicas (Datos Tono)

	Función	
	1	2
Pecho	-,128	,682
Cabeza	-,102	,737
Cuello	,763	-,356
Espalda	1,377	-,403
Flanco	-1,121	,525

Anexo 4. Resultados del análisis discriminante con los valores morfométricos

Autovalores

Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	3,685(a)	92,8	92,8	,887
2	,284(a)	7,2	100,0	,470

Coefficientes estandarizados de las funciones discriminantes canónicas

	Función	
	1	2
Longitud total del Pico	-,332	-,525
Longitud pico desde la Narina	1,213	-,011
Comisura	-,466	,472
Tarso	-,039	,191
Ala	-,147	,707
Cola	,491	,018